

doi:10.3969/j.issn.1673-9833.2014.06.003

p73基因多态性与非小细胞肺癌遗传易感性分析

王霜霜, 董林利, 汤建新, 李文

(湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用重点实验室, 湖南 株洲 412007)

摘要: 采用两对引物-聚合酶链反应(PCR-CTPP)方法分别对100例非小细胞肺癌患者和120例健康对照者进行p73基因多态性检测, DNA测序验证基因分型结果, 对p73基因多态性与非小细胞肺癌的相关性进行分析, 探讨湖南省地区人群中p73基因多态性与非小细胞肺癌遗传易感性的关系。试验结果表明, PCR-CTPP法和测序得到的基因分型结果完全吻合, 100例肺癌患者的p73基因型分布如下: GC/GC型60例(60%)、GC/AT型36例(36%)、AT/AT型4例(4%), 与携带p73 GC/GC基因型者比较, 携带AT/AT基因型者的肺癌患病风险增加3.4倍($OR=3.387$, $95\%CI=1.055\sim 10.875$, $P=0.032$), 而携带GC/AT基因型者肺癌风险也呈增加趋势, 但是无显著性差异($OR=1.183$, $95\%CI=0.672\sim 2.082$, $P=0.561$)。p73基因多态性可能与湖南省地区人群非小细胞肺癌遗传易感性相关。

关键词: NSCLC; p73基因多态性; PCR-CTPP

中图分类号: Q75

文献标志码: A

文章编号: 1673-9833(2014)06-0013-04

p73 Gene Polymorphism and Genetic Susceptibility to Non-Small Lung Cancer

Wang Shuangshuang, Dong Linli, Tang Jianxin, Li Wen

(Key Laboratory of Green Packaging and Biological Nanotechnology Application,
Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: Used PCR-CTPP to detect the p73 gene polymorphism among 100 patients with NSCLC and 120 healthy controls respectively and DNA direct sequencing verified the results of genotypes. Analyzed the association between p73 gene polymorphism and NSCLC, and explored the correlation between p73 gene polymorphism and susceptibility to NSCLC in the Hunan population. The experiment results showed that the results of PCR-CTPP and the sequencing genotyping results were consistent, p73 genotype distribution in 100 lung cancer patients are as follows: GC/GC 60 cases (60%), GC/AT 36 cases (36%), AT/AT 4 cases (4%). Compared with the carriers of GC/GC genotype, the carriers of AT/AT genotype significantly increased 3.4 times the risk of NSCLC ($OR=3.387$, $95\%CI=1.055\sim 10.875$, $P=0.032$), also the carriers of GC/AT genotype tended to increase the risk of NSCLC, but had no significantly difference ($OR=1.183$, $95\%CI=0.672\sim 2.082$, $P=0.561$). The p73 gene polymorphism may have the relation with the susceptibility to NSCLC in the Hunan population.

Keywords: SCLC; p73 gene polymorphism; PCR-CTPP

0 引言

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,

NSCLC)是肺癌的主要类型,为全世界最常见的恶性肿瘤之一,特别是在男性中容易发生^[1],严重地威胁着人类的健康。肺癌是一个与环境、职业、吸烟

收稿日期: 2014-08-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61171061), 湖南省自然科学基金资助项目(12JJ4082, 14JJ2049), 湖南工业大学自然科学基金资助项目(2013HZX04), 湖南省教育厅科学研究基金资助项目(14B050)

作者简介: 王霜霜(1989-), 女, 湖南益阳人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为分子生物学, E-mail: 997747598@qq.com

通信作者: 李文(1980-), 男, 湖南望城人, 湖南工业大学讲师, 博士, 主要从事生物医学工程方面的教学与研究,

E-mail: liwendream@sohu.com

等因素高度相关的生物学复杂疾病,遗传因素也起了重要作用,个体间细胞周期、DNA修复能力和凋亡控制能力的差异可能决定不同个体肿瘤的遗传易感性^[2]。研究肺癌与基因多态性之间的相关性有助于阐述肺癌的发病机制,包括它的形成和发展,对肺癌病人的诊断和预后起着重要作用。

p73基因位于人类染色体1p36.33位置,研究发现在p73第2外显子起始密码子AUG上游一个茎环结构中存在2个自然关联的单核苷酸多态性(G4C14-A4T14),可能影响基因表达^[3]。已有研究对这2个多态性与其他肿瘤的相关性进行了探讨^[4-6],但结论不一致。有研究发现,中国北方人群^[7]和非西班牙裔白人AT单倍型患肺癌风险比GC/GC型显著增加^[8];相反,另一研究发现,中国人群中携带AT单倍型者患肺癌风险显著降低^[9];还有研究发现,在韩国^[10]和日本人群^[11]中此多态性与肺癌患病风险无显著相关性。这些研究结果表明,不同的人群中p73 G4C14-A4T14多态性与肺癌患病的相关性可能不同。

目前,检测基因突变的方法有很多种,如PCR-RFLP、PCR-CTPP、PCR-SSCP、测序等。其中PCR-RFLP法操作复杂且费事,要考虑酶切位点是否存在;PCR-SSCP法只能做筛查,结果必须经DNA测序确定;测序法是检测DNA突变的“金标准”,但是因其费用高,无法普遍应用于临床。而PCR-CTPP技术成本较低、操作简便且结果稳定,所以本文基于病例-对照研究,采用PCR-CTPP(polymerase chain reaction with confronting two-pair primers)法结合直接测序法对湖南省地区100例肺癌患者和120例正常对照者血样进行了p73多态性检测,进而分析了其与肺癌的相关性,探讨湖南地区人群中p73基因多态性与肺癌遗传易感性的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本文收集湖南省株洲市中心医院和湖南省肿瘤医院肿瘤科2013年1月—2014年4月住院患者的血液样品,包括100例肺癌患者和120例健康对照者。血样分装在抗凝管中于-80℃超低温冰箱中保存。所有研究对象均知情并同意,本研究获医学伦理委员会批准同意。

1.2 主要材料与仪器

主要试验试剂有:KI、异戊醇、无水乙醇、异丙醇、硼酸、氯化钠、三氯甲烷(氯仿)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、浓盐酸等,均为国产

分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司生产;琼脂糖,西班牙Biowest公司生产;PCR Master Mix, DNA Marker 100 ladder, DNA Marker 5000 ladder, Tris-base, 上海生工生物工程有限公司生产。

主要试验仪器有:IF300-150制冰机,IIshin Lab公司;XMT-DA恒温水浴锅,余姚市亚星仪器仪表公司;Centrifuge541离心机,Eppendorf公司;101-1AB电热鼓风干燥箱,天津市泰斯特仪器有限公司;S0100振荡器,美国Labnet公司;WD-900SL 23-2微波炉,格兰仕有限公司;DYY-10C电泳仪,北京六一仪器厂;11200328凝胶成像仪,北京五洲东方科技发展有限公司;9700基因扩增仪,ABI公司。

1.3 DNA的提取

本试验从外周血提取基因组DNA采用的是改良的KI法^[12],具体操作为:将-80℃冰冻的抗凝血置于37℃恒温水浴锅中解冻,取300μL于1.5mL EP管中,加入无菌双蒸水(ddH₂O)900μL,混匀后以10000r/min转速离心3min,弃上清液;加入100μL浓度为5mol/L的KI溶液,振荡30s使其充分混匀;加入300μL 0.9% NaCl溶液,750μL氯仿/异戊醇(体积比为24:1)混合液,立即振荡30s,充分混匀后以10000r/min转速离心10min;吸取400μL上清液于另一EP管中,各加400μL异丙醇,轻轻混匀后以12000r/min转速离心5min,弃上清;加1mL 70%乙醇,以12000r/min转速离心5min;弃乙醇,烘干至无乙醇味;加入80μL TE缓冲液,在55℃下水浴10~20min,使其溶解,间隔5min摇匀一次;提取完后采用质量分数为1%琼脂糖凝胶电泳法检测,用凝胶成像仪观察并记录结果,提取成功的DNA样品放入-20℃冰箱中保存备用。

1.4 PCR-CTPP法对p73基因分型

检测p73基因第2外显子G4C14-A4T14位点的PCR-CTPP引物列于表1,各引物均由上海生工生物工程有限公司合成。PCR反应体系为15μL:7.5μL PCR master mix混合液,2.5μL ddH₂O,两对引物各加0.5μL,1μL模板DNA。PCR反应条件是:在95℃预变性5min,在95℃变性40s,在60℃退火处理40s,在72℃延伸40s,共35个循环,最后在72℃延伸5min。基因扩增完后,取10μL PCR产物与溴酚蓝混匀,加入质量分数为2%琼脂糖凝胶梳孔里,凝胶成像仪观察并记录结果。统计每个样本的p73基因分型结果,各抽取1份p73的3种不同基因型(GC/GC型,AT/AT型,GC/AT型)的普通PCR扩增产物,送至上海生工生物公司测序验证。

表1 PCR-CTPP 法两对引物

Table 1 The two pairs of primers by PCR-CTPP

引物名称	引物序列(5'-3')	引物长度/bp	T _m 值/℃
上游外引物(F1)	CCACGGATGGGTCTGATCC	19	61.9
下游外引物(R1)	GGCCTCCAAGGGCAGCTT	18	61.9
上游内引物(F2)	CCTTCCTTCCTGCAGAGCG	19	61.9
下游内引物(R2)	TTAGCCCAGCGAAGGTGG	18	59.6

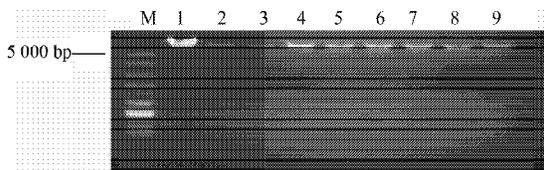
1.5 统计学分析

以 χ^2 检验方法比较病例组和健康组中基因型和等位基因的分布差异, 采用多因素 Logistic 回归通过 ORs 值、95%CI 值分析 p73 基因多态性与肺癌遗传易感性的相关性。所有数据均采用 SPSS 17.0 处理, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 基因组 DNA 的鉴定

图1为提取的基因组DNA电泳图。采用质量分数为1%琼脂糖凝胶电泳检测, 如图所示, 9个DNA样品均具有一条较清晰的亮带, 且DNA样品紫外检测 A₂₆₀/A₂₈₀ 在1.5~2.2之间, 说明基因组DNA提取成功, 可以用于下一步 PCR-CTPP 扩增实验。



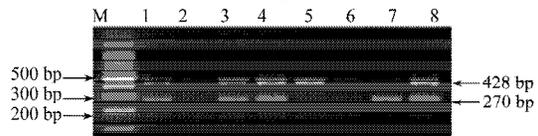
M: 5 000 bp DNA ladder marker; 1~9: 对应 DNA 样品数

图1 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 The agarose gel electrophoresis of DNA samples

2.2 PCR-CTPP 法对 p73 基因分型鉴定

图2为PCR-CTPP扩增产物的电泳图。如图所示, p73 基因 PCR 扩增产物经质量分数为2%琼脂糖凝胶电泳检测, 与DNA Marker 条带相比较, 各泳道中均有清晰的亮带, 图中可见3种DNA片段, 其中扩增出428, 270和193 bp三个条带的为GC/AT型; 428, 193 bp两个条带的为GC/GC型; 428, 270 bp两个条带的为AT/AT型。



M: 100 bp DNA Ladder Marker; Lane 1, 3, 4 为 GC/AT 型; Lane 2, 5, 6 为 GC/GC 型; Lane 7, 8 为 AT/AT 型。

图2 p73 PCR-CTPP 电泳结果

Fig.2 The electrophoresis of p73 gene by PCR-CTPP

2.3 直接测序验证

针对上述 p73 基因分型3种结果, 选取样品 S1,

S2, S3 送至上海生工生物工程公司测序部直接测序, 结果如图3所示。在230和240 bp 两处(如图方框标注), 样品 S1 检测到单一的G峰和C峰, 显示其为GC/GC 基因型; 样品 S2 在230 bp 处同时检测到G峰和A峰, 在240 bp 处同时检测到C峰和T峰, 显示其为GC/AT 基因型; 而样品 S3 检测到单一的A峰和T峰, 表明其为AT/AT 基因型。测序结果可表明DNA直接测序法与PCR-CTPP 法基因分型结果完全一致。

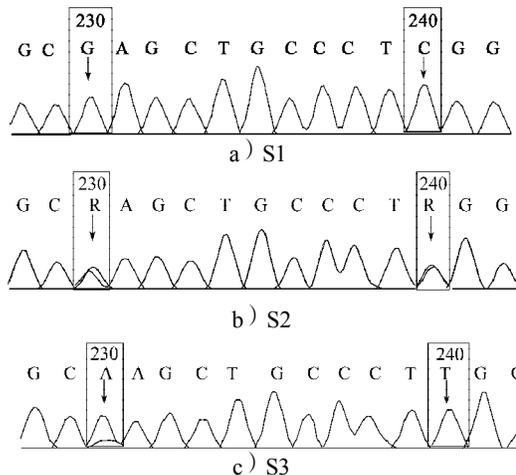


图3 p73 基因 PCR 产物测序图

Fig.3 The sequencing pattern of p73 gene PCR product

2.4 统计分析

2.4.1 研究对象的基本资料分析

本文中100例病例组和120例对照组的统计学特征见表2。表中数据显示年龄和性别差异均无统计学意义 ($P=0.824, \chi^2=0.049$; $P=0.225, \chi^2=1.471$), 喝酒因子在病例组和对照组中无显著差异性 ($P=0.596, \chi^2=0.281$)。但是吸烟人群中病例组明显高于对照组, 两者有显著性差异 ($P=0.000, \chi^2=15.450$)。表明吸烟显著增加了肺癌的患病风险, 是湖南地区研究人群的肺癌危险因素。

表2 肺癌病例组和正常对照组的一般性状分析

Table 2 General character analysis of lung cancer cases and controls

变量	病例组		对照组		P 值	χ^2
	个数	占总量/%	个数	占总量/%		
年龄	≤ 45	46	46	57	0.824	0.049
	>45	54	54	63		
性别	男	74	74	97	0.225	1.471
	女	26	26	23		
吸烟	是	69	69	51	0	15.450
	否	31	31	69		
喝酒	是	41	41	45	0.596	0.281
	否	59	59	75		

2.4.2 p73 基因多态性与肺癌风险的相关性分析

病例组和对照组中 p73 基因型和等位基因分布频率见表 3。结果表明, 100 例肺癌患者 GC/GC 基因型为 60%, GC/AT 基因型为 36%, AT/AT 基因型为 4%, 而 120 例对照组中 GC/GC, GC/AT 和 AT/AT 基因型频率分别为 52%, 37% 和 12%, 2 组差异具有统计学意义 ($P=0.032$, $\chi^2=4.594$)。多因素 Logistic 回归分析显示, 与携带 p73 GC/GC 基因型者比较, 携带 AT/AT 基因型者的肺癌患病风险增加 3.4 倍 ($OR=3.387$, $95\%CI=1.055\sim 10.875$, $P=0.032$), 而携带 GC/AT 基因型者肺癌风险也呈增加趋势, 但是无显著性差异 ($OR=1.183$, $95\%CI=0.672\sim 2.082$, $P=0.561$), 携带 p73 AT 单倍型基因型者的肺癌患病风险比 GC 单倍型基因型者增加 1.6 倍 ($OR=1.519$, $95\%CI=0.985\sim 2.345$, $P=0.058$)。

表 3 p73 基因型和等位基因的分布与肺癌风险的相关性

Table 3 The correlation of p73 Genotype and allele frequencies with the risk of lung cancer

基因型	病例组 / 个	占总量 / %	P 值	χ^2	OR(95%CI)
GC/GC	60	60	-	-	1.000(reference)
GC/AT	36	36	0.561	0.039	1.183(0.672~2.082)
AT/AT	4	4	0.032	4.594	3.387(1.055~10.875)
GC allele	156	78	-	-	1.000(reference)
AT allele	44	22	0.058	3.596	1.519(0.985~2.345)

3 结论

本研究的测序结果显示 PCR-CTPP 技术得到的基因分型结果和 DNA 直接测序得到的基因分型结果完全一致, 说明 PCR-CTPP 是一种非常省时且操作简单的 SNP 等位基因分型方法, 具有较高的应用价值。

统计结果表明, 病例组和对照组的差异具有统计学意义 ($P=0.032$, $\chi^2=4.594$)。分析显示与携带 p73 GC/GC 基因型者比较, 携带 AT/AT 基因型者的肺癌患病风险增加 3.4 倍, 而携带 GC/AT 基因型者肺癌风险也呈增加趋势, 但是无显著性差异。携带 p73 AT 单倍型基因型者的肺癌患病风险比 GC 单倍型基因型者增加 1.6 倍。

综上所述, 本研究发现 p73 基因多态性可能与湖南地区人群非小细胞肺癌遗传易感性有关, 因其样本量不太多, 还不能证实这一相关性, 后期试验需扩大样本量, p73 基因在非小细胞肺癌中发生发展中的具体作用也需进一步研究。

参考文献:

[1] Jemal Ahmedin, Bray Freddie, Center Melissa M, et

al. Global Cancer Statistics[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011, 61(2): 69-90.

[2] 胡志斌, 马红霞, 谭文, 等. 肺癌易感性与 p73 基因多态性的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(2): 106-109.

Hu Zhibin, Ma Hongxia, Tan Wen, et al. Research of Lung Cancer Susceptibility and p73 Gene Polymorphism[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2005, 26(2): 106-109.

[3] Mourad Kaghad, Helene Bonnet, Annie Yang, et al. Monoallelically Expressed Gene Related to P53 at Lp36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers[J]. Cell, 1997, 90(4): 809-819.

[4] Yoshimitsu Niwa, Nobuyuki Hamajima, Yoshiko Atsuta, et al. Genetic Polymorphisms of p73 G4C14-to-A4T14 at Exon 2 and P53 Arg72Pro and the Risk of Cervical Cancer in Japanese[J]. Cancer Letters, 2004, 205(1): 55-60.

[5] Li Guojun, Sturgis M S, Wang Li'e, et al. Association of a p73 Exon 2 G4C14-to-A4T14 Polymorphism with Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(10): 1911-1916.

[6] Daniella Pfeifer, Gunnar Arbmán, Sun Xiaofeng. Polymorphism of the p73 Gene in Relation to Colorectal Cancer Risk and Survival[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(1): 103-107.

[7] Zhang Xiaoi, Li Xu, Wu Zhihao, et al. The p73 G4C14-TO-A4T14 Polymorphism Is Associated with Risk of Lung Cancer in the Han Nationality of North China[J]. Molecular Carcinogenesis, 2013, 52(5): 387-391.

[8] Li Guojun, Wang Lie, Robert M Chamberlain, et al. p73 G4C14-A4T14 Polymorphism and Risk of Lung Cancer[J]. Cancer Research, 2004, 64(19): 6863-6866.

[9] Hu Zhibin, Miao Xiaoping, Ma Hongxia, et al. Dinucleotide Polymorphism of p73 Gene Is Associated with a Reduced Risk of Lung Cancer in a Chinese Population[J]. International Journal of Cancer, 2005, 114(3): 4455-460.

[10] Choi Jineun, Kang Hyoyoung, Chae Myunghwa, et al. No Association Between p73 G4C14-to-A4T14 Polymorphism and the Risk of Lung Cancer in a Korean Population[J]. Biochemical Genetics, 2006, 44(11/12): 543-550.

[11] Akio Hiraki, Keitaro Matsuo, Nobuyuki Hamajima, et al. Different Risk Relations with Smoking for Non-Small Cell Lung Cancer: Comparison of TP53 and TP73 Genotypes [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2003, 4(2): 107-112.

[12] 杨少迪. MicroRNA 靶基因多态性与肿瘤遗传易感性的相关性研究[D]. 株洲: 湖南工业大学, 2014.

Yang Shaodi. Correlation Study of MicroRNA Target Gene Polymorphism and Tumor Genetic Susceptibility[D]. Zhuzhou: Hunan University of Technology, 2014.

(责任编辑: 申剑)